

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 9 日現在

機関番号：83903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890305

研究課題名(和文) 脂質によるタウ凝集の制御

研究課題名(英文) Tau aggregation regulated by membrane lipid

研究代表者

住岡 暁夫 (Sumioka, Akio)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・分子基盤研究部・室長

研究者番号：00431320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：タウ蛋白質の凝集形成は、アルツハイマー病(AD)原因因子の一つであると考えられている。本計画で私は、膜脂質によるタウ凝集制御モデルを提案し検証に取り組んだ。タウと脂質二重膜の相互作用を検証した結果、タウが特異的に結合する膜脂質成分X1を同定した。さらに、タウの脂質結合領域を同定し、結合の仕組みを明らかにした。脂質によるタウ凝集誘導を検証した結果、X1がタウの凝集形成を抑制することを明らかにした。興味深いことに、膜脂質成分X1がAD患者で減少していることが複数の研究グループから報告されている。以上は、脂質の代謝異常がタウの病変を介して神経変性に至るというAD進行モデルの可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Aggregation of Tau protein would be one of the causative factor for Alzheimer's Disease (AD). In this study, I addressed a role of membrane lipid for Tau aggregation. I examined an interaction between Tau and lipid bilayer. In a result, I identified lipid X1 as a specific interactor of Tau protein. Furthermore I reveal a mechanism of the interaction by using Tau mutants. Then I examine the effect of lipid X1 on Tau pathology by ThT assay, and I found that X1 strongly inhibit their aggregation. Interestingly, it is reported that lipid X1 is decreased in AD patients. These finding potentially suggest hypothesis that abnormal lipid metabolism would undergo neurodegeneration through Tau pathology.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：神経科学 生化学 認知症

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は日本で最も多い認知症の一つであるが、現在まで根本療法が存在せず、治療薬の早急な開発が望まれる。神経原繊維変化 (NFT) は、AD の病理学的特長の一つである。NFT の主要構成成分は高度にリン酸化修飾を受けたタウ蛋白質の凝集体である。NFT が観察される領域では神経脱落が起きており、AD の進行に伴い NFT の分布が広まることから、NFT は神経変性に関わっていると考えられる。また、家族性前頭側頭葉型認知症 (FTDP-17) でタウの遺伝子異常がパーキンソン病症状をもたらすように、タウの異常は神経変性の原因の一つであると考えられる。以上から、タウ凝集の仕組みを明らかにして、NFT 形成を阻害することが重要である。

2. 研究の目的

AD 治療薬の開発にあたり、タウ凝集の仕組みを明らかにして、NFT 形成を阻害することが重要である。しかし、精製したタウは単独では非常に安定である。そのため、試験管系での凝集誘導には、ヘパリン等の強い負電荷性誘導剤が必要である (Goedert M, et al., 1996)。それでは、生体内でタウはどのように凝集するのだろうか？

興味深いことにタウの凝集誘導に細胞膜成分の一つで極性脂質のホスファチジルセリンも有効であると報告がある (Chirita, et al., 2003)。また、タウが細胞膜に局在するという報告もある (Brandt R, et al., 1995, Elbaum-Garfinkle S, et al., 2010)。そこで私は、タウ凝集の場として脂質二重膜に注目し、脂質によるタウ凝集制御モデルを提案し、検証に取り組んだ。

3. 研究の方法

脂質によるタウ凝集制御モデルの検証にあたり、私は以下の研究目標 I-III に取り組んだ。

I. タウと脂質二重膜の相互作用

膜上でのタウの凝集・局在制御を考える上で、タウが脂質二重膜へ直接結合するモデルを検証する。生体内のタウの膜への分布を生化学的分画によって確認する。タウと脂質二重膜の相互作用を、精製タウと人工リポソームを用いてリポソーム浮遊法で検証する。また簡易で迅速な多検体検索法として膜オーバーレイ法で、タウに特異的に結合する膜脂質成分を探索する。

II. 脂質によるタウの凝集誘導

膜脂質成分によるタウ凝集の誘導・抑制を試験管系で検証する。精製タウと各脂質成分を配合した人工リポソームを用いてタウ凝集を観察する。タウ凝集の進行は、タウ凝集体に特徴的なシート構造をチオフラビン T で染色し測定する。また、ヘパリンを凝集誘導体として利用し、膜脂質によるタウ凝集の抑制作用を観察する。

III. 細胞膜によるタウの凝集制御

細胞内でのタウの凝集制御を示すため、膜脂質成分変化による細胞内タウの凝集への作用を検証する。膜脂質成分を外部からの投与する手法と合成酵素遺伝子を発現させる手法を細胞系で試みる。凝集タウの観察を簡便にするため、FTDP-17 変異型タウを恒常的に発現させた培養細胞を利用する。そして、界面活性剤不溶なタウ凝集物を蟻酸で可溶化後、SDS-PAGE、Western blot で観察し、タウ凝集の制御を検証する。

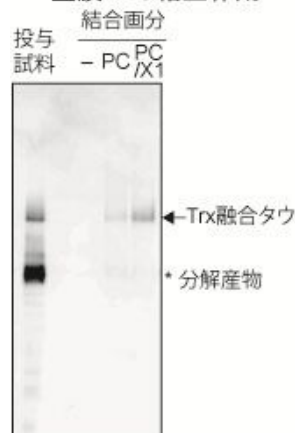
4. 研究成果

研究目標 I

生体内でのタウの分布を確認するため、マウスの脳の生化学的に分画した。その結果、膜画分においてタウの分布が観察された。そして、マウス脳から抽出した脂質成分で再構成した人工リポソームと精製したタウタンパク質を用いて、リポソーム浮遊法によって相互作用を検討した所、タウと膜脂質の相互作用が観察された。

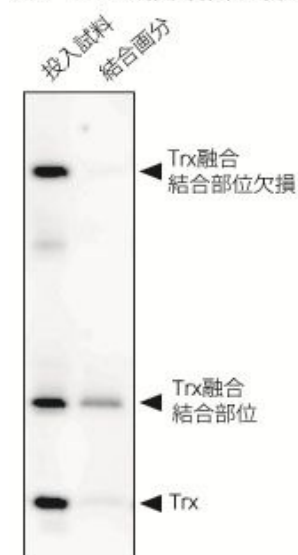
そこで次に、タウが結合する膜脂質成分の探索を試みた。これを目的にニトロセルロース膜上にスポットされた各脂質成分と精製タウの相互作用を膜オーバーレイ法で観察した。その結果、タウに特異的に結合する膜脂質成分 X1 を明らかにした。また、X1 を配合した人工リポソームと精製タウを用いてリポソーム浮遊法により検討し、脂質二重膜上の X1 とタウの相互作用を確認した (図 1)。

図1 タウとX1の脂質二重膜上の相互作用



以上をうけて研究目標を進展させ、タウと脂質二重膜の相互作用の仕組みの解明に取り組んだ。これを目的に、膜脂質との結合部位を、部分欠損変異型タウと膜脂質の相互作用を観察した。その結果、タウ内のある部位を欠損させた変異型タウで、膜脂質成分との結合が失われること、この部位のみを有する変異型タウは、膜脂質に結合することを見出した。これらの観察から、膜脂質への結合に必要な十分なタウ内の結合部位を決定した(図2)。

図2 タウの脂質結合部位



次に、結合部位内の特徴的なアミノ酸の繰り返し配列に注目した。この配列をアラニンに置換した変異型タウを用いた結合実験により、変異型タウで脂質二重膜との相互作用の減少が観察された。この結果より、この特徴的な繰り返し配列が脂質二重膜への結合に関与することが明らかになった。

さらに、結合部位の内部に位置するリン酸化修飾配列に注目した。これらのリン酸化修飾部位をアスパラギン酸に置換した擬似リン酸化変異型タウを用いた結合実験により、変異型タウで脂質二重膜との相互作用の減少が観察された。この結果から、タウのリン酸化修飾がタウと膜脂質の相互作用を調節していることを明らかにした。

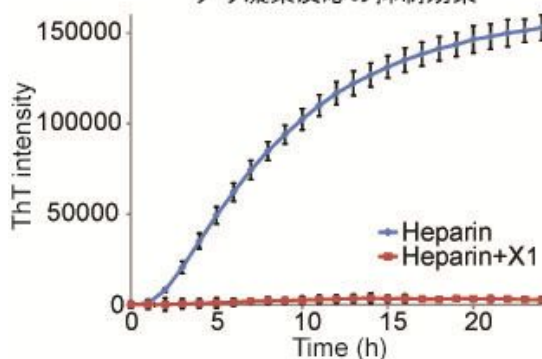
研究目標 II

膜脂質によるタウ凝集制御を検証するため、本年度は膜脂質存在下の精製タウの試験管系での凝集反応を観察した。各脂質成分を配合した人工リポソームによって誘導される、精製タウの凝集形成をチオフラビン T による染色で測定した。その結果、タウと特異的に結合する膜脂質成分 X1 を配合した人工リポソームにおいて、タウの凝集誘導は観察されなかった。一方、膜脂質成分 X2 を配合

した人工リポソーム存在下で、タウ凝集の誘導が観察された。

また、ヘパリンを凝集誘導体として利用し、各脂質成分を配合した人工リポソームによるタウ凝集の抑制作用を検討した。その結果、膜脂質成分 X1 を配合した人工リポソーム存在下において、タウの凝集は、非存在下と比較して顕著な減少が観察された(図3)。

図3 膜脂質X1によるタウ凝集反応の抑制効果



研究目標 III

膜脂質成分変化による細胞内タウの凝集制御を検証するため、本年度は細胞膜成分の調節と、これを確認するための評価法の確立を試みた。

一時的な手段として培養細胞への外部投与方法を試みた。外部投与方法の陽性統制群として、膜脂質成分 X1 の脂肪鎖に蛍光基ニトロベンゾオキサジアゾール (NBD) を付加した X1-NBD を利用し、細胞膜への X1 の挿入を確認した。また、X1-NBD の外部投与と処理を行った培養細胞を用いて、膜脂質成分 X1 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体による、細胞染色の実験条件を検討し、染色による膜脂質成分 X1 の検出法を確立した。

膜脂質成分 X1 は細胞において、普遍的に含有される膜脂質成分から、2 つの合成酵素による 2 段階の反応によって産生される。そこで、これらの合成酵素遺伝子の cDNA を internal ribosome entry sites (IRES) で繋いだ発現ベクターを作製した。この発現ベクターを培養細胞へ導入し、染色により膜脂質成分 X1 の発現が確認できる定常発現株を獲得した。

以上の通り私は、タウが特異的に結合する脂質成分 X1 を同定し、相互作用の仕組みを明らかにした。そして、脂質 X1 によるタウ凝集の抑制作用を試験管系で示した。さらに、細胞膜の脂質 X1 の調節法とその評価法を確立した。これらを元に、細胞膜脂質成分変化による細胞内でのタウの凝集制御を検証していきたい。

また大変興味深いことに、健常人に比較してAD患者で、野生型マウスに比較してADモデルマウスで、膜脂質成分 X1 が減少していることが複数の研究グループより報告されている。これらの知見は、ADにおいて膜脂質成分 X1 の代謝異常がタウの病変を促進し、その結果神経変性に至るというモデルの可能性を示唆している。私は今後、この新たなAD発症仮説を検証していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

該当なし

〔学会発表〕(計 1 件)

住岡 暁夫 タウ結合分子 (膜脂質による Tau 病変制御モデルの検証) タウ研究ミーティング, 2013 年 8 月 9 日、大府

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当なし

取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/department/nba/sumi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住岡 暁夫 (SUMIOKA, Akio)

国立長寿医療研究センター・室長

研究者番号: 00431320

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

後藤 麻子 (Goto, Asako)

国立長寿医療研究センター・研究員

研究者番号: 90455460

高島 明彦 (Takashima, Akihiko)

国立長寿医療研究センター・部長

研究者番号: 00154774